

Comparación de las pruebas de PCR y Elisa indirecta para el diagnóstico de Leucosis enzootica bovina en ganado Blanco Orejinegro (BON) y relaciones filogenéticas de los virus reportados en Colombia.

Por:

Victor Hugo Becerra Giraldo

Asesor:

Juan Carlos Rincón Flórez

Universidad Tecnológica de Pereira

Facultad de Ciencias de la Salud

Pereira, Risaralda

Comparación de las pruebas de PCR y Elisa indirecta para el diagnóstico de Leucosis enzootica bovina en ganado Blanco Orejinegro (BON) y relaciones filogenéticas de los virus reportados en Colombia.

Victor Hugo Becerra Giraldo¹, Jun Carlos Rincón²

¹Estudiante de Medicina veterinaria y zootecnia. Grupo de investigación BIOPEC. Universidad Tecnológica de Pereira, victor.becerra@utp.edu.co. ²Docente asesor, programa de Medicina veterinaria y Zootecnia. Grupo de investigación BIOPEC. Universidad Tecnológica de Pereira.

Resumen

El blanco orejinegro (BON) es una raza bovina criolla, que lleva más de 500 años de desarrollo en el trópico de nuestro país, es una raza que ha sido catalogada como resistente a diferentes enfermedades, entre ellas a la Leucosis enzootica bovina. La leucosis enzootica bovina es una enfermedad retroviral que tiene tropismo por los linfocitos B y algunos linfocitos T, posee gran patogenicidad en el sistema linfoide creando tumoraciones en nódulos linfáticos, cavidades estomacales, nervio ocular y otras partes anatómicas. Posee diferentes métodos de diagnóstico en los que se encuentran la PCR y la Elisa indirecta, una prueba duplica el material genético y la otra prueba encuentra anticuerpos respectivamente, tiene gran importancia en el sector por tener repercusiones en los costos de producción de leche y carne; se realizará una comparación entre esas pruebas para identificar una posible resistencia que posee el (BON) hacia la leucosis enzootica bovina, ayudando a que más productores puedan creer en los genes de nuestros ganados criollos colombianos.

Palabras clave: Ganado criollo, Retrovirus, Epidemiología, Pruebas de laboratorio

Abstract

The Blanco orejinegro (BON) is a creole bovine race, that takes more than 500 years of development in the tropic of our country, is a race that has been catalogued as resistant to different diseases, among them to the bovine leukosis virus. Bovine leukosis virus is a retroviral disease that has tropism by B lymphocytes and some T lymphocytes, has great pathogenicity in the lymphoid system creating tumors in lymph nodes, stomach cavities, ocular nerve and other anatomical parts. It has different diagnostic methods in which are the PCR and the indirect Elisa, a test duplicates the genetic material and the other test finds antibodies respectively, it has great importance in the sector for having repercussions in the production costs of milk and meat; a comparison will be made between these tests to identify a possible resistance that has the (BON) towards the bovine leukosis virus, helping that more producers can believe in the genes of our Colombian creole cattle.

Introduccion:

La leucosis enzootica bovina es una enfermedad infecciosa de origen retroviral que tiene afinidad por los linfocitos B, puede ser transmitida iatrogénicamente, vía transplacentaria o por medio del calostro(1). La mayoría de los animales son asintomáticos, pueden presentar leucocitosis o linfosarcoma; las neoplasias no solo se producen en tejido linfoide, se pueden producir en nervio ocular, cavidades estomacales y útero. Se han llevado diferentes estudios en hatos lecheros de la raza Holstein en Colombia en el departamento de Antioquia dictando una seroprevalencia para el país del 42.7 % (2). Para la detección de leucosis enzootica bovina se pueden utilizar diferentes pruebas, entre algunas de ellas se encuentran la Elisa indirecta y PCR anidada, la prueba Elisa indirecta se utiliza comúnmente para encontrar anticuerpos en sangre, por lo tanto son indicativos de exposición al patógeno, la PCR anidada se emplea para duplicar millones de veces el material genético del virus al interior del individuo y enfatizar en una pequeña porción del ADN, por lo tanto, son indicativos la presencia del virus (infección), por ese motivo, algunas veces las

pruebas no concuerdan ya que las pruebas tienen diferentes niveles de sensibilidad y especificidad. Además, las pruebas de Elisa pueden ser indicativas de exposición, pero no necesariamente de infección, porque puede haber factores fisiológicos del animal que afectan el resultado de la prueba. Recientemente, en el ganado Blanco orejinegro relacionado con la raza Holstein, se encontraron bajas prevalencias respecto al Holstein (posible resistencia). Sin embargo, es necesario saber si las prevalencias y seroprevalencias presentan correspondencia para entender mejor el posible escenario de resistencia del ganado BON colombiano y demás razas criollas colombianas.

El ganado blanco orejinegro (BON) es un recurso genético importante para la ganadería colombiana que lleva más de 500 años adaptándose a las condiciones del trópico colombiano, haciéndolo muy rustico. Además, puede traer importantes aportes productivos, como disminución de costos para ectoparásitos y vacunas. El ganado (BON), ha sido catalogado como resistente a diversas enfermedades infecciosas, se desempeñan muy bien en el trópico, aprovechando pasturas de baja calidad, posee buena habilidad materna, precocidad sexual, alta fertilidad y una mayor productividad en cruces F1 para carne y leche (3) puede ser doble propósito, presenta aplomos apropiados para lugares montañosos y empinados, orejas, piel y hocico pigmentados lo que le permite una mejor tolerancia a los rayos solares y resistencia a ectoparásitos como el nuche (*Dermatobia hominis*), son individuos nobles, de fácil manejo(4), por estas excelentes propiedades es importante poder mantenerla bajo observación y producción, pero aún falta caracterizarlo y entender cómo funciona su resistencia a diferentes enfermedades, este estudio será aprovechado por los ganaderos y estudiantes de Medicina Veterinaria, Zootecnia y M.V.Z para que tengan en cuenta el valor genético de nuestros recursos criollos sobre todo del (BON).

Las enfermedades infecciosas están siempre vinculadas a las producciones animales, continuamente serán un problema por la poca resistencia que algunos individuos puedan presentar, trayendo consigo múltiples pérdidas para los productores que desean alcanzar un alto nivel de tecnificación y un buen desempeño en la economía de los países en vía de desarrollo, pero se ha evidenciado que algunas razas autóctonas colombianas como el blanco orejinegro (BON) pueden ser resistentes a diferentes patologías como la leucosis enzootica bovina, la diarrea viral bovina (DVB),

Estomatitis vesicular, Brucelosis, Fiebre aftosa, Leptospirosis, Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). Es muy probable que el ganado (BON) sea resistente a varias enfermedades, ya que lleva un largo periodo de tiempo adaptándose a la topografía y medio ambiente colombiano, algunos investigadores citan que sus factores de resistencia a estomatitis vesicular estarían determinados por INF, también a un grupo de BON que investigaron su resistencia para la fiebre aftosa *in vitro* 55 de 60 (93.3%) animales fueron resistentes, al subtipo A 24 Cruzeiro y 50 de 97 (52.8%) fueron al subtipo O1 Campos (5) generando así una mayor expectativa y valor genético para esta raza. Los ganaderos colombianos todavía no se dan cuenta del valor genético que tiene el (BON) y optan por razas foráneas que no pueden ser resistentes a las enfermedades ya mencionadas; en el caso de la Leucosis enzootica bovina es una enfermedad que en Colombia no es de control oficial (6) y los ganaderos no se ven obligados a reportarla, pero tiene serias complicaciones económicas como costos en diagnóstico, descarte de animales, disminución de los índices productivos, impacto en índices reproductivos, tratamientos de patologías concomitantes, no se pueden exportar cabezas de ganado, tampoco comercializar semen o embriones por su modo de patogenicidad (7). Esta enfermedad es silenciosa, presenta un curso clínico lento y una incubación de 1 a 5 años. La infección por leucosis enzootica bovina puede ser de manera vertical, horizontal directa o por insectos hematófagos; En la manera vertical la posibilidad de que los terneros estén infectados representa del 3.8 al 26%; en la manera horizontal puede transmitirse por sangre (1 ul de sangre es suficiente para infectar un individuo), saliva, semen, leche, calostro o cualquier otra secreción que contenga linfocitos infectados(8). Se pueden utilizar como pruebas diagnósticas de Leucosis enzootica bovina a la prueba de western blot, es un técnica que consiste en la detección de proteínas con anticuerpos específicos contra ellas mediante electroforesis en gel(9), Elisa indirecta, PCR, utilizada para amplificar el gen de importancia millones de veces y hacerlo visible; según citan autores la PCR es una prueba no muy rápida pero conveniente para tipificación del virus de la leucosis bovina(10), Un estudio llevado a cabo en Chile dice que la capacidad para detectar animales positivos de la prueba de Elisa y PCR es muy similar (seropositividad del 97%) pero puede verse afectado por distintos factores, uno de ellos es una etapa de hemolisis de los eritrocitos con NH₄CL se describe un efecto inhibidor de residuos de

hemoglobina sobre la Taq polimerasa, otro factor importante entre la relación de estas dos pruebas tiene que ver con la carga de linfocitos infectados, aunque esto no tiene soporte por muchos estudios(11). Investigaciones realizadas dicen que la zona con más porcentaje de incidencia de leucosis enzootica bovina en Colombia es la zona Andina, con un 24.9%, debido a un alto flujo de ganado, ya que se cuenta con tres importantes subastas en Pereira, Medellín y Berrio (Antioquia) que transportan ganado desde todos los rincones del país(12). La zona andina también es la que más individuos criollos y de la raza (BON) posee, se investigó a cerca de que tan propensos eran las razas criollas a estar infectadas con el virus de la leucosis enzootica bovina; con unos datos sorprendentes se encontró de que no había rastros de la enfermedad en (BON), san martinero y romosinuano a pesar de la alta prevalencia en la región (13), haciendo creer que nuestras razas criollas poseen una resistencia a la leucosis enzootica bovina y a otras enfermedades infecciosas.

Existen diferentes genotipos del virus reportados en Colombia en el ganado Bovino, la mayoría de los reportes corresponden al genotipo 2 y 3, en Brasil se encuentran aislados los genotipos 1, 2, 5, 6 y 7, en 2016 se reportó un nuevo genotipo en Bolivia el 9, previos estudios dictan que el nivel de prevalencia en Argentina de leucosis enzootica bovina es de hasta el 84%(14). Sin embargo, aún no es muy claro las relaciones filogenéticas entre los genotipos del virus que se encuentran en Colombia reportados en el GenBank y su relación con las secuencias reportadas en otras regiones de América y el mundo. Este tipo de análisis comúnmente se basa en la secuenciación de un fragmento del gen env del virus y su posterior análisis filogenético para establecer las relaciones entre los diferentes virus que estén circulando en la región.

En el valle del cauca se viene dirigiendo un proyecto en el cual están vinculados la gobernación departamental y CORPOICA brindando recursos para aquellos ganaderos que deseen utilizar el Hartón del valle como parte de su explotación, y siguiendo la investigación de sus genes de resistencia (15), lo mismo se realizó en la zona cafetera con el (BON) donde CORPOICA protege la extinción de esta raza de bovinos e intenta involucrar a mas ganaderos de la zona para que puedan acceder fácilmente a la genética seleccionada y aumentar el número de individuos criollos en el país, también nuestro recurso criollo se podrá cruzar con otras razas especializadas

permitiendo que las próximas generaciones posean vigor híbrido y sean superiores en producción a sus progenitores. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue comparar el diagnóstico de leucosis enzootica bovina por medio de las pruebas de ELISA indirecta y PCR anidada en ganado blanco orejinegro (BON) y determinar las relaciones filogenéticas de los virus reportados en Colombia como aporte para identificar una posible resistencia.

Materiales y métodos

Toma de muestras

Se tomó la población de ganado blanco orejinegro (BON) de Colombia, a partir del inventario de ASOCRIOLLOS, se muestrearon en total 12 fincas, de las cuales se tomarán proporcionalmente al tamaño de la finca. Teniendo en cuenta el sexo, peso y edad a los animales para un total de 132 individuos, a partir de estos animales se realizó la extracción de ADN utilizando el kit de extracción para tejidos de Qiagen, se separaron los sueros utilizando la centrifugadora a 2500 rpm por 5 minutos, los sueros y el ADN fueron almacenados a -20°C hasta su análisis.

Pruebas de ELISA

Se realizaron pruebas de Elisa usando el kit SVANOVIR® BLV gp51- Ab lote B09507 en el equipo de ELISA 5 in 1 crocodile moniworkstation (Titertek Berthold®) automatizado. A partir de la densidad óptica, se determinó la positividad y se estimó la seroprevalencia de la enfermedad.

Pruebas de PCR

Por otra parte, a partir de las muestras de ADN se realizó una PCR anidada utilizando los cebadores Primestar Polymeras y las condiciones que se detallan a continuación:

- 2 ul de 2.5 uM de dNTP mix
- 1X de tampón PCR (ThermoScientific®)
- 3 µM MgCl₂
- 1U de TopTaq Polimerase.
- 5 µl de ADN
- Un volumen final de 25 µl.
- Termociclador
- 5 µl 5x PS GXL Buffer
- Primera toma de agua destilada 13.5
- Segunda toma de agua destilada 14.5

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo con las prevalencias y los respectivos intervalos de confianza del 95% usando las dos pruebas diagnósticas. Posteriormente, se realizó un análisis de correspondencia y una prueba chi-de homogeneidad para identificar posibles diferencias. Todo se realizó mediante el programa R core team. (16).

Análisis filogenético

Se realizó una búsqueda en el genbank de las secuencias del gen env de leucosis enzootica Bovina reportadas en Colombia y en países de latinoamerica como Uruguay, Argentina, Brasil y Chile, se colectó la información sobre la especie de la que fue encontrado el virus. A partir de las secuencias reprotadas, se realizó una edición inicial, un alineamiento de las secuencias, la identificación del mejor modelo de sustitución nucleotídica y se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con Bootstrappin y 1000 iteraciones en el software MEGA-X.

Resultados y discusión.

La prueba de Elisa ha sido reportada varias veces por generar falsos positivos esto se debe a que mide la exposición a antígenos virales y no es necesariamente un positivo para la enfermedad, lo que hace necesario realizar pruebas confirmatorias por otros métodos. Por el contrario, la prueba de PCR detecta el provirus en el genoma del animal, lo que indica que se dio la infección. Entre estos dos métodos diagnósticos hay diferencias significativas e importantes. En este trabajo la prevalencia de leucosis enzootica Bovina por PCR fue del 9% y por ELISA fue del 39%, como indica la Tabla 4.

Tabla 4. Prevalencias y correlación entre pruebas de ELISA y PCR para el diagnóstico de Leucosis Enzootica Bovina en Ganado Blanco Orejinegro.

Prevalencia	0,093023256	0,395348837
Error estandar	0,062269587	0,104815334
Desviacion estandar	0,292168645	0,491793112
LI	0,030753669	0,290533503
LS	0,155292843	0,500164171
Valos P	1,79133E-75	2,2092E-06
Correlacion	0,32553939	0,314181432
Positivos	8	34

Algunos estudios anteriores han reportado que algunos kit de ELISA basados en la detección de anticuerpos anti-env presentan una alta tasa de falsos positivos e incluso se han desarrollado pruebas más específicas donde el resultado confirma los hallazgos realizados previamente por algunos autores(17), quienes habían sugerido la presencia de animales inmunotolerantes a la Leucosis enzootica bovina, observación que es siempre cuestionada al argumentarse que se debería a una mayor sensibilidad del PCR (11). En general, la prueba Gold Standard para el diagnóstico de leucosis ha sido AGID, pero recientemente, se ha recomendado el uso de técnicas moleculares como la PCR ya que presenta alta sensibilidad y detecta el provirus y no sólo los anticuerpos.

Posteriormente se quiso mirar a partir de las secuencias del gen-env, cuáles eran las relaciones existentes. Para esto, se seleccionaron por tamaño y región 23 secuencias del GENBANK reportadas de diferentes zonas geográficas de Colombia con alta producción lechera como San pedro de los milagros (Ant), Sotaquirá (Boyaca), Madrid (Cundinamarca), Subachoque (Cundinamarca), Puerto Salgar (Cundinamarca) y otro municipio del norte como Aguachica (Cesar) netamente cárnico, como indica la figura 1. También, del resto de Sudamérica, incluyendo países como Argentina, Brasil, Chile y Uruguay que presentan una producción ganadera importante.

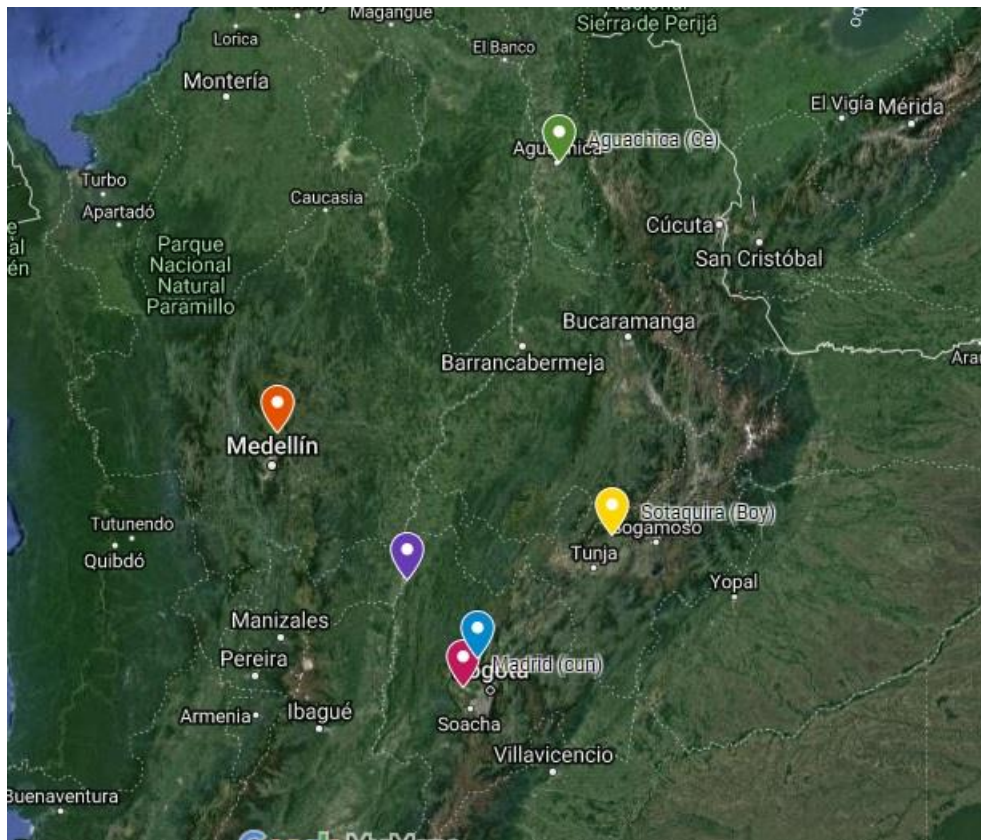


Figura 1: Localización geográfica de cada uno de los municipios de los que se tomaron las secuencias.

Estadísticas básicas

Se alinearon las secuencias exitosamente y se recortaron a un largo estándar de 400pb, de los cuales se tuvieron 148 sitios conservados y 245 sitios variables, lo que muestra la variabilidad tan importante presente en el gen env del virus. También se encontraron 25 sitios polimórficos o parsimoniosos y 220 sitios únicos (singleton).

Composición nucleotídica:

Las composiciones de las secuencias pueden observarse en la tabla 3, en donde se encuentra detallado con las bases nitrogenadas que las componen y la frecuencia de cada una, se observó un promedio de Timina y uracilo de 26.4, citosina de 30.8, Adenina 22.8 y de Guanina de 20.0.

Tabla 3: Composicion nucleotidica

		T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
Uruguay 38		27.0	31.0	22.6	19.3	393	23.8	28.5	26.2	21.5	130	28.0	34.8	20.5	16.7	132	29.0	29.8	21.4	19.8	131
Uruguay13		26.7	31.3	22.6	19.3	393	23.8	28.5	26.2	21.5	130	27.3	35.6	20.5	16.7	132	29.0	29.8	21.4	19.8	131
Colombia Villa Pamina		26.7	30.8	22.9	19.6	393	24.6	26.9	26.9	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.0	29.8	20.6	20.6	131
Colombia Subachoque17		26.5	31.3	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	28.2	30.5	20.6	20.6	131
Colombia PuertoSalgar 340		26.7	31.0	22.6	19.6	393	23.8	28.5	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.8	29.0	20.6	20.6	131
Colombia Puerto Salgar 138		26.7	31.0	22.6	19.6	393	23.8	28.5	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.8	29.0	20.6	20.6	131
Colombia Madrid Carmen		26.7	31.0	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.0	29.8	20.6	20.6	131
Colombia aguachica 525		27.0	31.0	22.6	19.3	393	23.8	28.5	26.2	21.5	130	26.5	35.6	20.5	17.4	132	30.5	29.0	21.4	19.1	131
Colombia Aguachica 3994		27.2	30.8	22.6	19.3	393	24.6	28.5	26.2	20.8	130	26.5	35.6	20.5	17.4	132	30.5	28.2	21.4	19.8	131
Colombia Aguachica 130-9		26.7	31.0	23.2	19.1	393	23.8	28.5	26.9	20.8	130	25.8	36.4	21.2	16.7	132	30.5	28.2	21.4	19.8	131
Colombia 50 SanPedro		26.5	31.3	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	28.2	30.5	20.6	20.6	131
Colombia 44 SanPedro		26.7	31.0	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.0	29.8	20.6	20.6	131
Colombia 43 SanPedro		26.5	31.3	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	28.2	30.5	20.6	20.6	131
Colombia 14 Subachoque		26.5	31.3	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	28.2	30.5	20.6	20.6	131
Colombia 13 Subachoque		26.7	31.0	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.0	29.8	20.6	20.6	131
Colombia 11 Sotaquir		26.7	31.0	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.0	29.8	20.6	20.6	131
Colombia 10 Sotaquir		26.7	31.0	22.6	19.6	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	29.0	29.8	20.6	20.6	131
Chile 58		26.5	31.3	23.2	19.1	393	24.6	27.7	26.9	20.8	130	25.8	36.4	19.7	18.2	132	29.0	29.8	22.9	18.3	131
Chile 1		26.0	31.8	22.4	19.8	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	25.8	36.4	21.2	16.7	132	27.5	31.3	19.8	21.4	131
Brasil 135		26.5	31.8	21.9	19.8	393	23.8	29.2	25.4	21.5	130	26.5	35.6	20.5	17.4	132	29.0	30.5	19.8	20.6	131
Brasil 40		21.6	21.8	26.9	29.7	394	19.7	22.0	28.8	29.5	132	20.5	22.7	26.5	30.3	132	24.6	20.8	25.4	29.2	130
Argentina LS-Zoo2		26.7	31.0	22.1	20.1	393	25.4	26.9	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	28.2	30.5	19.1	22.1	131
Argentina LS-TSR2		26.5	31.3	22.1	20.1	393	24.6	27.7	26.2	21.5	130	26.5	35.6	21.2	16.7	132	28.2	30.5	19.1	22.1	131
Avg.		26.4	30.8	22.8	20.0	393.0	24.2	27.7	26.3	21.8	130.1	26.3	35.1	21.2	17.4	132	28.8	29.4	20.9	20.8	131.0

Sustitución nucleotídica:

El mejor modelo de sustitución nucleotídica encontrado fue Kimura 2 parámetros + I de acuerdo a los criterios del estadístico AIC y BIC (tabla 2), este modelo fue utilizado para la realización del análisis filogenético posterior e indica que se toman diferentes tasas de mutación para transiciones y tranversiones. Además, incluye el parámetro I que indica la inclusión de los modelos que asumen la proporción de los sitios que varían como los que no.

Tabla 2: Análisis para el modelo de sustitución nucleotídica.

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
K2+I	45	3.082.528	2.763.064	-1.336.302	0.14	n/a	6.20
K2+G	45	3.085.220	2.765.757	-1.337.648	n/a	1.76	3.53
K2	44	3.086.800	2.774.426	-1.342.993	n/a	n/a	5.42
K2+G+I	46	3.089.704	2.763.152	-1.335.336	0.13	3.59	6.28
T92+I	46	3.091.364	2.764.812	-1.336.165	0.14	n/a	6.19
T92+G	46	3.094.009	2.767.457	-1.337.488	n/a	1.78	3.55
T92	45	3.095.354	2.775.890	-1.342.715	n/a	n/a	5.44

Al realizar el análisis filogenético se encontró que a pesar de que la mayoría de secuencias del sur de Colombia se encuentran familiarizadas y son genéticamente parecidas, presentan algunas diferencias con las del norte del país; las del norte son más parecidas en su composición a las secuencias del sur del continente familiarizándose fuertemente con Brasil 135, lo que hace pensar que producciones en la costa atlántica han adquirido de cierta manera un tipo de virus diferente proveniente de Brasil o el sur del continente, lo que hace suponer que anteriormente se ha presentado intercambio de ganado bovino indicus en pie entre estos dos países lo que muestra el parecido del virus de leucosis ezootica bovina, como se muestra en la figura 2.

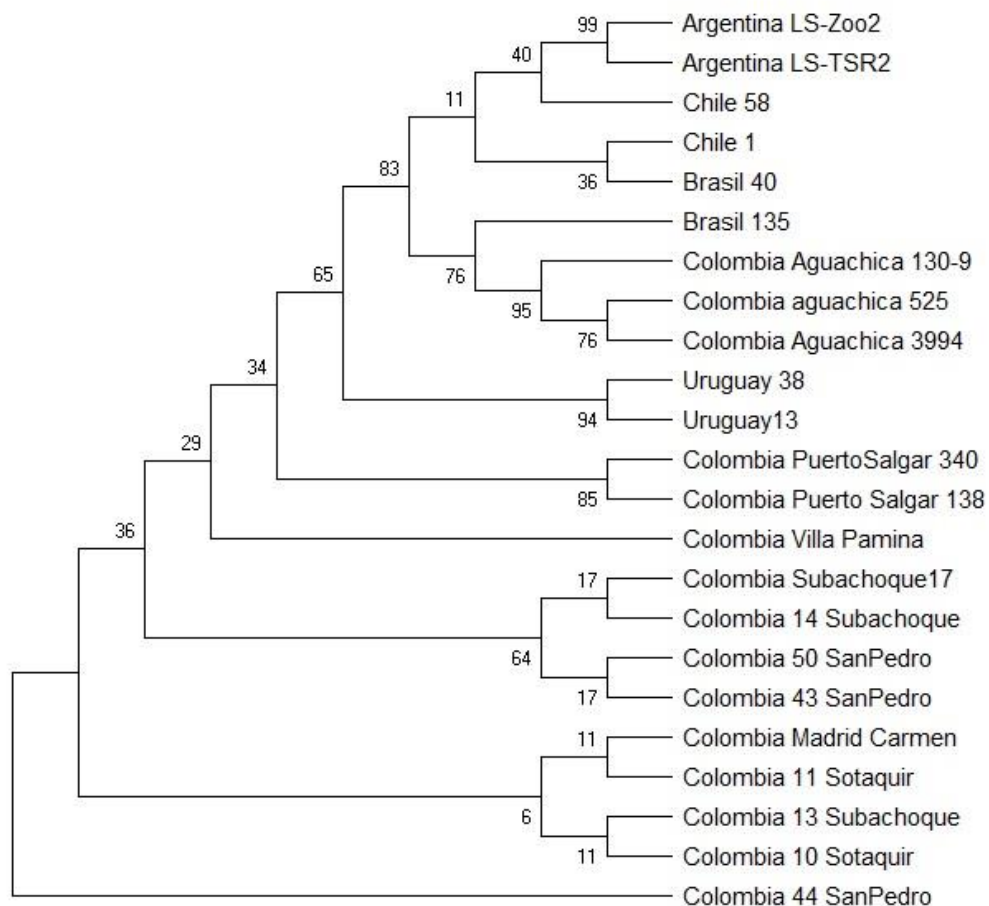


Figura 2: Árbol filogenético de secuencias del virus de Leucosis enzootica bovina realizado con el software Mega-X **(A)** Construido por máxima verosimilitud utilizando

el modelo kimura 2 parametros, los bootstrap evaluados son el resultado de 1000 replicaciones.

Distancias genéticas:

Se compararon las distancias genéticas en las cuales se observó que en la secuencia número 11 (Colombia 50 San pedro) es muy parecida a la 13 (Colombia 43 San pedro) y la numero 14 (Colombia 14 Subachoque), al comparar las secuencias colombianas con las secuencias de otros países como la numero 18 (Chile 58) empiezan a tener diferencias significativas, las secuencias número 8, 9 y 10 (Aguachica 130-9, Aguachica 525, Aguachica 3994) son diferentes a todas las demás del país, se encuentra genéticamente más cercana a secuencias de Brasil como (Brasil 135), las secuencias de Argentina, Uruguay y chile son muy similares, por su cercanía geográfica, estos análisis concuerdan y permiten entender mejor las relaciones filogenéticas presentadas en el árbol anterior.

Conclusiones y recomendaciones

En este estudio se realizó la comparación entre las pruebas de ELISA y PCR para la detección de Leucosis enzootica bovina, queriendo buscar una relación de la seropositividad entre estas, dados los resultados de diferencias significativas e importantes entre las pruebas se sugiere, utilizar pruebas más puntuales para la detección de la enfermedad como el AGID que ha sido catalogada como la prueba gold estándar como lo referencian algunos autores(11), en la cual el porcentaje de falsos positivos se reduce y permite una sensibilidad diagnostica mucho más eficiente, pero no descartamos la PCR ya que es una eficiente y rápida prueba en la que se pueden basar aquellos países o personas que no puedan tener a la mano pruebas de mejor sensibilidad diagnostica, en cuanto a la aparente circulación del virus en Colombia se presentan 2 tipos, uno en zonas lecheras y otro en zonas cárnicas, se diferencia uno del otro ya que el virus de las zonas cárnicas es muy parecido a virus del sur del continente. Como se reportan en estudios anteriores, la mayoría de razas criollas colombianas no han sido reportadas con Leucosis enzootica bovina, se

presume que estas secuencias fueron adquiridas de razas como Holstein o Gersey para las zonas lecheras donde son las razas predominantes en estos puntos geográficos, dictan estudios anteriores realizados en el departamento de Antioquia donde muestrearon 500 vacas de las cuales se diagnosticaron por prueba de PCR un total de 219 vacas positivas a leucosis enzootica bovina que equivalen al 44% de infección en el departamento(2). Para zonas cárnicas las secuencias se pudieron haber adquirido de razas como Gyr o Brahman, lo que incrementa el valor de nuestros recursos criollos, donde los ganaderos deben darse cuenta que es lo que estas razas tienen para ofrecer y conocer como guardar el valor genético que pueden brindar para mejorar las ganaderías colombianas(13).

Con este estudio se quiso dar a conocer que tan efectivas son las razas criollas en relación a razas foráneas que poco a poco pierden calidad, incrementando el intervalo entre partos, disminuyendo la producción de leche o carne, teniendo más enfermedades en los hatos y no solo por el mal manejo que algunos ganaderos dan a sus producciones, sino por la poca rusticidad que puedan presentar algunos animales frente al clima del trópico, incrementando el riesgo de quebrantar la salud pública y poner más trabas al proceso de exportaciones que necesita Colombia, para eso se pueden instaurar programas de manejo de F1 o razas criollas puras, que aumenten la producción, la eficiencia y generar diversidad genética.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mis padres, a mi padre Héctor Hugo Becerra Restrepo por su apoyo incondicional en este proceso, a mi madre Ana Delfa Giraldo Loaiza (Q.E.P.D), de no ser por el esfuerzo de su vida, no podría haber hecho esto posible, desearía que pudieras ver hasta donde he podido llegar, todo esto es para ustedes.

También agradezco a la Universidad Tecnológica de Pereira que ha sido un honor estudiar en sus instalaciones, con muy buenos docentes y al grupo de investigación Biomolecular y pecuaria (BIOPEC) que en conjunto con mi tutor Juan Carlos Rincón Flórez tuvieron en cuenta mi participación en este proyecto.

Bibliografía

1. Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz MT, Boxus M, et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses*. 2011.
2. Úsuga-Monroy C, Echeverri-Zuluaga JJ, López-Herrera A. Detección molecular y serológica del virus de la leucosis bovina en una población de vacas Holstein, de Colombia. *Rev Mex Ciencias Pecu*. 2018;
3. Lopez A, Saldarriaga OA, Arango AE, Rugeles MT, Zuluaga FN, Olivera M, et al. Ganado Blanco Orejinegro (BON): Una alternativa para la produccion en Colombia. *Rev Colomb Ciencias Pecu*. 2001;
4. GERMAN MARTINEZ CORREAL M.V., MSC. P. BLANCO OREJINEGRO (BON) - Ganado Criollo Colombiano [Internet]. [cited 2019 Mar 26]. Available from: <http://www.ganadocriollo-colombiano.com/razas-2/blanco-orejinegro-bon-1>
5. López A, Salazar A, Restrepo G, Zuluaga F, Ossa J. Resistencia natural, in vitro, a los virus de estomatitis vesicular y de rinotraqueitis infecciosa en ganado Blanco Orejinegro. *Rev Colomb Ciencias Pecu*. 2002;
6. FEDEGAN. Sanidad animal | Fedegan [Internet]. [cited 2019 Mar 23]. Available from: <https://www.fedegan.org.co/programas/sanidad-animal>
7. Alejandra L, Forero B. LEUCOSIS VIRAL BOVINA PREVALENCIA E IMPACTO ECONOMICO EN COLOMBIA: REVISION BIBLIOGRAFICA [Internet]. [cited 2019 Mar 23]. Available from: [http://repository.ucc.edu.co/bitstream/ucc/4913/2/Articulo Final - LEUCOSIS VIRAL BOVINA.pdf](http://repository.ucc.edu.co/bitstream/ucc/4913/2/Articulo%20Final%20-%20LEUCOSIS%20VIRAL%20BOVINA.pdf)
8. Laverde Trujillo. LM, Benavides Benavides B. Virus de leucosis bovina: un enemigo silencioso. *J Agric Anim Sci*. 2012;
9. González E, Oliva G, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray M. LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO (ID, ELISA-I, WB, PCR) EN BOVINOS INOCULADOS

EXPERIMENTALMENTE. ANALECTA Vet. 2001;

10. Felmer R, Zúñiga J, Recabal M, Chávez R. Diagnóstico y tipificación del virus de la leucosis bovina mediante una prueba de PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche. Arch Med Vet. 2009;
11. Felmer R, Zúñiga J, Recabal M. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. Arch Med Vet. 2006;
12. Betancur CH, Rodas JG. SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS VIRAL BOVINA EN ANIMALES CON TRASTORNOS REPRODUCTIVOS DE MONTERÍA SEROPREVALENCIA OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS IN ANIMALS WITH REPRODUCTIVE PROBLEMS IN MONTERIA. [cited 2019 Mar 23]; Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/693/69313111.pdf>
13. Hernández D, Posso A, Benavides J, Muñoz J, Giovambattista G, Álvares A. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. Acta Agronómica. 2011;60(4):312–8.
14. Polat M, Takeshima S, Hosomichi K, Kim J, Miyasaka T, Yamada K, et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. Retrovirology [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2019 Aug 14];13(1):4. Available from: <http://www.retrovirology.com/content/13/1/4>
15. FEDEGAN. Expectativa en el Valle por ordenanza en favor del Hartón | Fedegan [Internet]. [cited 2019 Mar 23]. Available from: <https://www.fedegan.org.co/noticias/expectativa-en-el-valle-por-ordenanza-en-favor-del-harton>
16. R Development Core Team . R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput. 2011;
17. Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. Virology. 1997 Oct 27;237(2):261–9.

